

311000
H0007/02
7. Mai 1971
26. November 1982

• BUNDESREPUBLIK **Offenlegungsschrift** • DE 3110072 A1



DEUTSCHES
PATENTAMT

• Anmelder:
Hewlett-Packard Company, Diagonal, 07000,
Wiesbaden, DE

P 3110072/0
7. 5. 82
26. 11. 82

• H.O.Z.
B01D 17/04
B01D 11/00
B01J 13/00

DE 3110072 A1

BEST COPY AVAILABLE

• Erfinder:
Hewlett-Packard

• Beschreibungswortsatz gem. § 45 Abs. 1 Satz 1 Pkt. 2:
DE-A-23 26 000
DE-A-23 27 177
US 23 45 000
DE-Brief: Almelo, Chemie-Laboren, 7. Auflage, 1972,
Satz 1950 bis 1959,
US-E: Journal of the American Oil Chemists Society Vol. 52,
1975, Seiten 22 bis 32;

• Verfahren zur Trennung von homogenen Saponifikations- und nichthomogenen Katalyse-Lösungen zu präparativen Zwecken und/oder zur Realisierung einer Analyse in nichtwässriger Phase

Es wird ein Verfahren zur Trennung homogener Katalyse- und aus wässrigen heterogenen Lösungen beschrieben. Das Verfahren besteht aus einem Trenntrichter, der auf die physikalischen und thermischen Eigenschaften, respektive auch der praktischen Anwendung in der wässrigen Lösung abgestimmt ist. Es werden durch einen zentrischen und horizontalen mechanischen Mechanismus eine weitere Aufteilung vorgenommen. Das Extraktionsverfahren beruht auf der Verteilung von wässrigen organischen Lösungsmittel auf einer wasserlöslichen Komponente, die eine Oberflächenspannung < 25 dyn/cm hat, und einer Komponente mit einer Viskosität von 1000 bis 10000 cP und einer Oberflächenspannung < 40 dyn/cm. Die Anzahl der wasserlöslichen Komponenten liegt 20 bis 50 Vol-% der Lösungsmittelzusammensetzung. Komponentenbestandteile wird bei der Flüssig-Flüssig-Trennung aus den heterogenen Lösungen homogener Katalyse auch in unterschiedlichen Zustand der wässrigen Phase - in Formen, die aus einer heterogenen Komponenten - keine Zersetzungen ausgesetzt, in der restlosen heterogenen Analyse, die die spezifischen Eigenschaften präsentiert und durchsetzt eingesetzt wird. (D1 10 072)

DE 3110072 A1

BEST AVAILABLE COPY

3118072

23.11.81

Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung von fettlöslichen Stoffen aus wässrigen Kolloidlösungen, dadurch gekennzeichnet, daß man einer lipophilen Substanzen enthaltenden Kolloidlösung eine Mischung aus einem wasserunlöslichen organischen Lösungsmittel mit einer Oberflächenspannung ≤ 25 dyn pro cm und einem organischen Lösungsmittel mit geringer Wasserlöslichkeit und/oder einer Oberflächenspannung ≤ 20 dyn/cm zufügt, die beiden Flüssigphasen miteinander durch Schütteln durchmischt und anschließend von einander trennt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Lösungsmittelphase ein geringeres oder höheres spezifisches Gewicht als die wässrige Phase hat.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als wasserunlösliches organisches Lösungsmittel mit geringer Oberflächenspannung ein Aliphat, ein aliphatischer Ether oder Thioether mit 6 oder mehr Kohlenstoffatomen, ein Halogenkohlenstoff oder Halogenkohlenwasserstoff mit einer Oberflächenspannung ≤ 25 dyn/cm (gegen Dampf oder Luft) für die Lösungsmittelmischung verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittelkomponente mit geringer Wasserlöslichkeit und/oder geringer Oberflächenspannung 1 ≤ 20 dyn/cm gegen Dampf oder Luft ein Alkohol mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen, ein primäres, sekundäres oder tertielles Amin mit 4 bis 12 Kohlenstoffatomen, ein aliphatischer Monoalkyläther von Athylenglykol mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, ein Dialkyläther von Diathylenglykol mit 8 bis 16 Kohlenstoffatomen oder Mischungen derselben verwendet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Volumenanteil der wasserunlöslichen Komponente 30 bis 90% der organischen Lösungsmittelmischung beträgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Vermischen einer wässrigen Kolloidlösung mit der organischen Lösungsmittelmischung zwischen den Kontaktstellen und den Trennpunkten der Flüssigphasen erfolgt.

3118072

20.11.81

- 10 -

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß bei Kolloidlösungen biologischer Herkunft das Vermischen der wässrigen Lösung mit der organischen Lösungsmittelmischung bei einer Temperatur zwischen 4°C und 60,5°C, günstigerweise zwischen 20°C und 41°C erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Durchmischung der Lösungen manuell oder automatisch erfolgt.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach Durchmischung die Phasentrennung der Lösungen nach einem
10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die unterschiedlichen spezifischen Dichten der Phasen berücksichtigt.
11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige einen Analyt enthaltende Phase zu analytischen oder präparativen Zwecken weiterverarbeitet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Aufarbeitung von Flüssigkeiten biologischer Herkunft ein chemischer, biologischer, biochemischer oder immunologischer Nachweis eines Analyts in der delipidierten wässrigen Phase ausgeführt wird.

81

3118072

23.11.81

Verfahren zur Trennung von lipophilen Bestandteilen aus wässrigen Kolloid-Lösungen zu präparativen Zwecken und/oder zum Nachweis eines Analyts in wässriger Phase

5 Zahlreiche Stoffe, die sich in organischen Lösungsmitteln lösen, die jedoch in wässrigem Medium unlöslich sind, können in Form einer Emulsion, d.h. in Gegenwart von niedermolekularen und/oder hochmolekularen Verbindungen mit amphiphilen Eigenschaften dennoch in der wässrigen Phase in Lösung gebracht werden. Insbesondere bei Naturstoffen, aber auch bei synthetischen Produkten können lipophile Stoffe (z.B. Neutralfette, fettlösliche Farbstoffe) die Weiterverarbeitung von hydrophilen Substanzen in der wässrigen Phase beeinträchtigen.

10 Sie müssen daher zum Zwecke der weiteren Aufarbeitung beseitigt werden. Verschiedene Verfahren sind entwickelt worden, die eine Extraktion von lipophilen Stoffen aus stabilen wässrigen, polymerhaltigen Lösungen ermöglichen (z.B. Extraktion mit Chloroform/Methanol bzw. Athanol; Isopropyläther/Butanol; Halogenkohlenwasserstoffen; Ather/Methanol bzw. Athanol). Diese Verfahren erweisen sich jedoch für die Untersuchung und/oder Verarbeitung eines wasserlöslichen Polymers, das sich durch seine Eigenschaften als Detergent auszeichnet, als unzureichend, denn typische in der wässrigen Phase erhaltenen Merkmale des Analyts werden durch diese Behandlung beseitigt. In der Biochemie wird der Verlust dieser Merkmale als "Denaturierung" bezeichnet.

15 Häufig ist hingegen eine Beseitigung von störenden lipophilen Bestandteilen aus der wässrigen Kolloidlösung unter Erhaltung der physikochemischen und/oder biologischen Eigenschaften eines Analyts in der wässrigen Phase zum Zwecke der weiteren Aufarbeitung notwendig. In einzelnen Fällen hat sich eine Extraktion der Lipide in einem

20 Zweiphasensystem als geeignet erwiesen: z.B. Ather/Wasser;

3118072

23.11.81

4

Halogenkohlenwasserstoffe bzw. Halogenkohlenstoffe/Wasser). Bei wässrigen Kolloidlösungen, die lipophile Bestandteile enthalten, ist jedoch bei diesen Verfahren eine ausreichende Durchmischung der Flüssigphasen nicht gewährleistet. Darüberhinaus bildet sich eine Zwischenphase, in der sich insbesondere ein Analyt mit Detergenteigenschaften anreichert. Er wird dadurch dem wässrigen Medium für den Nachweis und/oder die weitere Verarbeitung entzogen. Ein Zusatz von neutralen Detergents (z.B. Polyäthyleneoxydederivaten) oder anionischen Seifen kann die Anreicherung von Polymeren wie z.B. Proteinen in der Zwischenphase nicht verhindern. 10

Überraschender Weise wurde festgestellt, daß eine Vorbehandlung von wässrigen kolloidalen Lösungen, die lipophile Bestandteile in emulgiert Form enthalten, mit einer Mischung eines wasserunlöslichen organischen Lösungsmittels mit geringer Oberflächenspannung (<25 dyn/cm gegen Dampf oder Luft) und einem niedermolekularen organischen Lösungsmittel mit nur geringer Wasserlöslichkeit, aber 15 die Oberflächenspannung des Wassers stark herabsetzenden Eigenschaften eine Beseitigung der Lipide aus der wässrigen Kolloidlösung in einem Ausmaß ermöglicht, das bei ausschließlicher Verwendung eines wasserunlöslichen organischen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches 20 nicht erreicht werden kann. Darüberhinaus wurde festgestellt, daß unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches mit den angegebenen Eigenschaften keine Phase zwischen der wässrigen und der organischen Phase ausgebildet wird, in der ein gegebenenfalls zu untersuchender polymerer 25 Analyt sich anreichert. Ferner ergab sich, daß die biologischen und/oder physikochemischen Eigenschaften eines zu untersuchenden Analyts in der wässrigen Phase erhalten bleiben und somit einem z.B. immunologischen oder biologischen Nachweis zugänglich sind, ohne daß ursprünglich 30 in der wässrigen Kolloidlösung vorhandene lipophile Substanzen den Nachweis störend beeinflussen.

3118072

23.11.81

- 5 -

In Vergleich zu den erwähnten herkömmlichen Methoden zeichnet sich das Verfahren dadurch vorteilhaft aus, daß es im Anbetracht der nur geringen Mengen der zu verwendenden Lösungsmitteligemische für eine Aufarbeitung von 5 Kolloidlösungen zeitsparend und weniger arbeitsintensiv ist, da sich für die weitere Aufarbeitung eines Analyts in der wässrigen Phase eine Beseitigung von organischen Lösungsmittelbestandteilen erübrigt.

10 Folgende organische Lösungsmittel mögen als Vertreter ihrer Verbindungsklasse aufgeführt sein:

I. Organische Lösungsmittel mit geringer Löslichkeit in wässrigem Medium und niedriger Oberflächenspannung

(C_0 dyn/cm)

15	$C_nH_{2n+m}-OH$	n:5-10; m:0 oder 2
	$C_nH_{2n+m}-NH_2$	n:4-12; m:0 oder 2
	$(C_nH_{2n+m})_2NH$	n:3-6 ; m:0 oder 2
	$(C_nH_{2n+m})_3N$	n:3-6 ; m:0 oder 2
20	$(C_nH_{2n+m}-O-CH_2CH_2-)_2O$	n:7-8 ; m:0 oder 2
	$C_nH_{2n+2}-(O-CH_2CH_2)_2-OH$	n:3-6 ; m:0 oder 2
	$C_nH_{2n+2}-CO-C_nH_{2n+2}$	n:1-3 ; m:3-6

II. Wasserunlösliche organische Lösungsmittel mit niedriger Oberflächenspannung (< 25 dyn/cm)

25	Fluor-Chlorkohlenstoffe und Fluor-Chlorkohlenwasserstoffe Aliphate aliphatische Äther und Thioäther mit 6 der mehr Kohlenstoffatomen
30	

3118072

23.11.81

Folgende Beispiele mögen den Vorteil des neu entwickelten Verfahrens verdeutlichen:

Beispiel :

5 Jeweils 0,5 ml Serum werden 10 Minuten mit a bis d der Lösungsmittelmischungen
 b bis e geschüttelt. Anschließend wird zentrifugiert und aus der wässrigen Phase die Lipidkonzentration gemessen.
 Die Ergebnisse zeigen, daß bei alleiniger Verwendung des
 10 Fluor-Chlorkohlenstoffpolymer als organisches Lösungsmittel eine unzureichende Lipidextraktion erreicht wird. Bei der Verwendung der angegebenen Lösungsmittelgemische (in
 Vol. Teilen) wird hingegen eine Extraktion von Triglycerid
 15 bzw. Cholesterin bis zu 98%, für Phospholipid bis zu 85%
 erreicht:
 a. Fluor-Chlorkohlenstoffpolymer (Frigen 113 Polymer)
 b. Cyclohexanol/Frigen 113 Polymer (25/75)
 c. n-Hexanol / Frigen 113 Polymer (25/75)
 d. 1-Heptanol/Frigen 113 Polymer (25/75)
 20 e. 1-Heptanol/Frigen 113 Polymer (25/75)

	Triglycerid (μ g/dl)	Cholesterin (μ g/dl)	Phospholipid (μ g/dl)
Serum nativ	160	510	350
25 a. Extraktion a	510	254	164
" " b	54	-	98
" " c	54	10	55
" " d	36	13	63
" " e	34	13	84

3118072

23.11.66

7

Beispiel 2

Extraktion von Lipiden in wässriger Kolloidlösung mit anderen als in Beispiel 1 angegebenen Lösungsmittelmixungen. 0,5 ml Serum wird mit 0,7 ml eines organischen Lösungsmittelteils bzw. einer Lösungsmittelmixung in der gleichen Weise behandelt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Ergebnisse zeigen den wesentlich höheren Effekt der angegebenen Lösungsmittelgemische bei der Lipidextraktion gegenüber den reinen wasserunlöslichen Lösungsmitteln. Die in Klammern angegebenen Quotienten kennzeichnen das Mischungsverhältnis der Volumina der einzelnen Lösungsmittelkomponenten.

	Triglycerid (mg/dl)	Cholesterin (mg/dl)	Phosphatid (mg/dl)
13 Serum nativ	653	290	351
Serum + CF_3CCl_2 *	151	101	80
Serum + Frigen 113 Pol. *107	64	109	—
Serum + CF_3CCl_2 /			
n-Hexylamin (95/5) 12	16	21	
20 " + CF_3CCl_2 /Diathy-			
len glycidmonobutyl-			
ether (80/20)	17	17	20
" + CF_3CCl_2 /			
n-Hexanol (75/25)* 33	24	41	
25 " + CF_3CCl_2 /Diathy-			
len glyciddiethyl-			
ether (95/5) 92	57	138	
" + Frigen 113 Polym./			
30 " + Frigen 113 Polym./			
Diathyleneglykolo-			
nobutyläther (80/20) 6	15	51	
" + Frigen 113 Polym./			
35 " + n-Hexanol (75/25) 31	20	80	
" + Frigen 113 Polym./			
Diathyleneglykoldi-			
ethyläther (80/20) 82	55	81	

*geringfügige Kieselpräzipitation in der Zwischenphase

3118072

Beispiel 3

Extraktion von Lipiden in Flüssigphase mit Hilfe weiterer Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische. Das Mischungsverhältnis beträgt 0,5 ml Serum und 0,7 ml organisches Lösungsmittel. Die in Klammern angegebenen Quotienten kennzeichnen das Mischungsverhältnis der Volumina der organischen Lösungsmittelkomponenten. Die Tabelle veranschaulicht den deutlich wirksameren Effekt der Lipidextraktion bei der Verwendung der angegebenen Lösungsmittelgemische.

	Triglycerid (mg/dl)	Cholesterin (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
0 Serum nativ	171	18.5	88
15 Serum + n-Hexan *	170	18.0	84
Serum + Diisopropyläther *	122	16.1	51
Serum + n-Hexan/n-Hexylamin (95/5)	3	1*	0
Serum + Diisopropyläther/n-Hexylamin (95/5)	8	11	0
Serum + n-Hexan/Diäthylenglykolenohutyläther (90/10)	0	11	12
Serum + Diisopropyläther/Diäthylenglykolenobutyläther (90/10)	0	3	0
Serum + CF_3CCl_2 /n-Octylamin (95/5)	0	13	10
Serum + CF_3CCl_2 /n-Hexylamin	38	3n	18

30 * geringfügige Eiweißpräzipitation in der Zwischen-Phase

3118072

• BUNDESREP.
DEUTSCHLAND



DEUTSCHE
PATENTAM

• Anmelder:
Wacker AG (Wacker)

• Dokumentations-Nr.
Wissenschaftliche D
maxon Formel (II)

H. Wacker M. Dr. an
dreas Wacker, Wacker
Chemie AG und Dr. a
ndreas von Knebel, D
Wissenschaftler aus
der Abteilung für
Vorprodukte, die 3-Hu
Cinnamyl-Chinone u
-3O₂-I, in herze
sartigen Anteile
Formel -30,2 in de
re verarbeitet Anteile
dr. und für den de
Fertigung der dage

Beispiel 4

Nachweis der Erhaltung der immunchemischen Eigenschaften
eines komplexbundenen antigenen Lipoproteins nach einer
Delipidierung in Flüssigphase.

5 0,1 ml einer Lösung eines aus menschlichem Serum isolierten
Lipoproteins (High Density Lipoprotein ,HDL) wurden mit 0,5ml
eines organischen Lösungsmittels nach Beispiel 1 ,Extraktions-
verfahren a bzw. b 10 min im Schüttelautomaten geschüttelt.
Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation in einer
10 Laborzentrifuge getrennt. 20 µl der wässrigen Phase wurden mit
2ml 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung
wurden mit einem Antiserum gegen Apolipoprotein AI,einem Prote-
inbestandteil der HDL,gemischt.Die Lichtstreuung der sich bil-
genden Immunkomplexe mit Apolipoprotein AI wurde über einen
15 Zeitraum von 2 Std. mit Hilfe eines Laser-Nephelometers gemes-
sen.
Die Messung ergab,daß die Reaktion mit nativer HDL,in der der
antige Analyt mit Lipid assoziiert ist, wesentlich langsamer
verläuft als nach einer Delipidierung nach dem Extraktionsver-
fahren b.Die Vorbehandlung der Probe nach dem Extraktionsver-
fahren a führte zum gleichen Ergebnis im immunchemischen Nach-
weis wie im Falle der unbehandelten Probe.Während nach der Li-
pidextraktion nach Verfahren b das Maximum des Immunnephelo-
metrischen Signals nach 90 min erreicht ist, ist die Immunreaktion
25 nach Extraktion nach dem Verfahren a nach 2 Std. noch nicht be-
endet.

DE 3118072

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image
problems checked, please do not report these problems to
the IFW Image Problem Mailbox.**